



“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado”

“Informe de Avances para protocolos de investigación”

Anexo 3 “Guía para la elaboración del protocolo de investigación”

INFORMACIÓN GENERAL

PROTOCOLO	
NO. DE REGISTRO 154.2018	Título: “Determinación de marcadores genéticos asociados al desarrollo de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B en población mexicana mestiza”
	*Servicio(s): INVESTIGACIÓN
	*Unidad Médica(s): CENTRO MÉDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE
	*Delegación(s): BENITO JUAREZ
	Fecha: 08 de Julio 2020
	Teléfono/Ext: 52005003/14252
	Fax.:

* Indicar el área geográfica donde se realizará el estudio, en caso de ser varios los lugares involucrados incluir todos los servicios y unidades médicas involucradas anexando también los nombres de las delegaciones a las que pertenece cada unidad médica.

PERSONAL ADSCRITO	NOMBRE	UNIDAD Y/O DEPARTAMENTO	INSTITUCIÓN	FIRMA
Investigador responsable	DRA. MARTHA LETICIA ALVARADO IBARRA	HEMATOLOGÍA	C.M.N. 20 DE NOVIEMBRE	
Investigador asociado 1	DRA. MÓNICA ESCAMILLA TILCH	INVESTIGACIÓN	C.M.N. 20 DE NOVIEMBRE	
Investigador asociado 2	DRA. REBECA PEREZ CABEZA DE VACA	INVESTIGACIÓN	C.M.N. 20 DE NOVIEMBRE	
Investigador asociado 3	DR. JUAN ANTONIO PINEDA JUÁREZ	INVESTIGACIÓN	C.M.N. 20 DE NOVIEMBRE	
Investigador asociado 4	DR. PAUL MONDRAGÓN TERÁN	INVESTIGACIÓN	C.M.N. 20 E NOVIEMBRE	
Investigador asociado 5	DR. JUAN PABLO MACÍAS FLORES	HEMATOLOGÍA	C.M.N. 20 E NOVIEMBRE	

Dirección postal completa del investigador responsable:
 Av. Félix Cuevas 540 Col. Del Valle, Cp. 03100 Delegación Benito Juárez, Ciudad de México.
 Correo electrónico: martha.alvarado@issste.gob.mx Red: 14478,14252



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los
Trabajadores del Estado”**
“Informe de Avances para protocolos de investigación”

INFORMACIÓN DEL PROYECTO

1. TITULO DEL PROTOCOLO.

Determinación de marcadores genéticos asociados al desarrollo de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B en población mexicana mestiza. Resultados preliminares.

2. RESUMEN.

Introducción: La leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (LLA-B) es una patología oncohematológica, caracterizada por la proliferación descontrolada de precursores celulares linfoides tempranos (linfoblastos). Para su desarrollo, se encuentran implicadas mutaciones en múltiples genes asociados en la maduración y replicación celular; siendo algunas relacionadas con el pronóstico de la enfermedad. Alteraciones en la vía de señalización celular *PI3K/Akt/mTOR* y *PTEN*, conllevan a la desregulación del crecimiento tumoral y la angiogénesis, así como las alteraciones en el factor de transcripción *Ikaros*, se asocian a la detención madurativa del linfocito B. La t(9;22)(q34.1;q11.2) se presenta en un 25% de los adultos con LLA (LLA Chr. Ph+), y es considerado un marcador de mal pronóstico. La variabilidad alélica de estos genes y su impacto en el desarrollo y presentación de LLA-B, no se encuentran caracterizados para la población mexicana mestiza.

Objetivo: Identificar y comparar los polimorfismos en los genes *PIK3CA*, *AKT1*, *MTOR*, *PTEN* e *IKZF1* en pacientes sanos y con LLA-B, su asociación con la presencia de cromosoma Philadelphia y su influencia en la susceptibilidad y/o protección del desarrollo de LLA-B, en población mexicana mestiza.

Metodología: A partir de muestras de sangre periférica y/o médula ósea de pacientes con LLA-B y controles clínicamente sanos (donadores de banco de sangre), se extrajo el DNA genómico y RNA mensajero para la determinación de los marcadores genéticos. Mediante técnica de PCR tiempo real (SALSA MLPA) se tipificaron los polimorfismos en los distintos genes y, mediante citometría de flujo, se analizó la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR/PTEN. Para identificar la delección en el gen IKZF1, el ensayo MLPA se realizó para todos los pacientes con B-ALL utilizando el kit SALSA P335, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Mediante la técnica de PCR tiempo real, se realizó la prueba de transcrito de fusión de TaqMan, para identificar los pacientes portadores de los genes de fusión BCR/ABL. Finalmente, se realizó la correlación estadística entre la presencia de los polimorfismos, Chr. Ph+ y la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR/PTEN con el desarrollo de LLA-B.



**“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los
Trabajadores del Estado”**
“Informe de Avances para protocolos de investigación”

3. INDICE.	
Título del proyecto	3
Resumen	3
Abreviaturas	4
Introducción	5
Antecedentes	5
Planteamiento del problema	9
Justificación	9
Hipótesis (si es el caso)	10
Objetivo General	10
Objetivos Específicos	10
Metodología de la Investigación	11
Prueba piloto (si es el caso)	16
Aspectos éticos	16
Consentimiento informado	
Conflicto de intereses	
Condiciones de bioseguridad	17
Recursos	17
Cronograma de actividades programadas	17
Resultados esperados y productos entregables	18
Aportación o beneficios para el Instituto	18
Perspectivas	18
Difusión	19
Patrocinadores	19
Referencias bibliográficas	19
Autorizaciones	26
Anexos	27



“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado”

“Informe de Avances para protocolos de investigación”

4. ABREVIATURAS.	
4EBP1	del inglés <i>Binding Protein 4E- 1</i> .
A	nucleótido Adenina.
ABL	oncogen de Abelson.
AKT	proteína de cinasa de serina/treonina RAC Alpha, sinónimo PKB.
AKT1	gen que codifica para proteína Akt.
BCR	de sus siglas en inglés <i>Breakpoint Cluster Region</i>
BCR/ABL	gen de fusión que se forma con la translocación del cromosoma 9 al 22.
CCS	controles clínicamente sanos.
CMN	Centro Médico Nacional.
DNA	del inglés <i>Deoxyribonucleic acid</i> .
G	nucleótido Guanina.
IGF-1	del inglés <i>Insuline like Growth Factor</i> .
IKZF1	gen que codifica para proteína Ikaros.
LLA	Leucemia linfoblástica aguda.
LLA-B	Leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B.
Mb	Megabases.
mRNA	del inglés <i>Messenger Ribonucleic acid</i> .
mTOR	proteína de diana de rapamicina en células de mamífero.
MTOR1	gen que codifica para proteína mTOR.
Ph+	Cromosoma Filadelfia positivo.
PI3K	proteína de fosfatidil inositol 3 kinasa.
PIK3CA	gen que codifica para PI3K.
PTEN	proteína de fosfatidilinositol 3, 4, 5- trifosfato 3- fosfatasa. Homólogo de fosfatasa y tensina.
PTEN	gen que codifica para proteína PTEN.
RNA	del inglés <i>Ribonucleic Acid</i> .
SNPs	del inglés, <i>Single Nucleotid Polimorphisms</i> .



“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado”

“Informe de Avances para protocolos de investigación”

5. INTRODUCCION.

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es un grupo de trastornos hematológicos malignos de progresión rápida, fenotípica y genéticamente heterogéneos, caracterizado por una proliferación y transformación maligna de células progenitoras linfoides, con extenso involucro a médula ósea, sangre periférica y, ocasionalmente, con involucro de sitios nodales y extranodales¹. La etiología es desconocida. Esta enfermedad se caracteriza por aberraciones cromosómicas recurrentes, mutaciones genéticas y alteraciones epigenéticas que son cruciales para la patogénesis de la enfermedad. La sintomatología más frecuente incluye: fiebre, linfadenopatía, problemas en la coagulación, anemia, hepato- esplenomegalia, pérdida de peso, entre otros²⁻⁴.

La LLA se clasifica por morfología⁵ y alteraciones genéticas recurrentes¹, siendo de suma importancia conocer la alteración específica para otorgar un tratamiento dirigido⁷. Una de las alteraciones citogenéticas más frecuentes en adultos con LLA, es el cromosoma Philadelphia, representando 20-30% de los casos⁸. Esta mutación es resultado de la translocación balanceada con rearreglo de dos cromosomas no homólogos, en el brazo largo del cromosoma 9 donde se encuentra el gen *ABL1* (oncogen de Abelson) y la porción distal del brazo largo del cromosoma 22 donde se encuentra el gen de *BCR* (por sus siglas en inglés *Breakpoint Cluster Region*), gracias a este intercambio se genera la fusión del gen *BCR/ABL1* [t(9;22) (q34;q11.2)], productora de la proteína quimérica BCR-ABL con actividad tirosina quinasa⁹. Esta proteína se le considera como una oncoproteína, debido a que tiene un papel central en la patogénesis de algunos tipos de LLA¹⁰.

La integración de la información obtenida mediante técnicas más novedosas de análisis genético, como el perfil de expresión génica (GEP), el análisis de polimorfismos de nucleótidos simple (SNP) y la secuenciación de próxima generación (NGS), han permitido una mejor definición del escenario molecular de la LLA y la identificación de una constelación de nuevas mutaciones¹¹. Sin embargo, aún no se han dilucidado el papel biológico de todas las mutaciones encontradas. Es de especial interés el análisis de mutaciones implicados en la alteración de la vía PI3K/AKT/PTEN/mTOR, la cual es una de las vías más frecuentemente alteradas en cáncer, su activación aberrante debido a variaciones genéticas en genes claves, se ha observado en diferentes neoplasias, incluyendo la LLA¹². De igual forma, aunque menos frecuente, existen mutaciones en el gen *IKAROS* (*IKZF1*) involucradas en ALL, asociadas con un riesgo incrementado de recaída¹³. Este gen, localizado en 7p12.27, juega un papel importante en el desarrollo y diferenciación del linfocito B, por lo que forma a ser parte de un blanco terapéutico¹⁴.

En México, existe escasa literatura sobre la variabilidad alélica en distintas poblaciones mexicanas mestizas¹⁵, por lo que la caracterización génica de distintas enfermedades, es de suma importancia para su correcto entendimiento y posible enfoque terapéutico. La variabilidad alélica de los genes involucrados en la leucemogénesis y su impacto en el desarrollo y presentación de LLA-B, no se encuentran caracterizados para la población mexicana mestiza.



“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado”

“Informe de Avances para protocolos de investigación”

6. ANTECEDENTES.

La leucemia linfoblástica aguda es una proliferación maligna de células linfoides bloqueadas en una etapa temprana de diferenciación que puede invadir la médula ósea, la sangre y los sitios extramedulares. Del 08-85% de los casos son de estirpe B y tiene un predominio en el género masculino¹.

De acuerdo con los datos de la Agencia de Investigación Internacional de Cáncer (IARC), la LLA abarca menos del 1% de cáncer en adultos, es el más común durante la infancia, ya que se presenta hasta en un 25% de todos los tipos de cáncer y hasta un 80% de las leucemias¹⁶. En el adulto, aunque menos frecuente, es una enfermedad devastadora. La incidencia de LLA sigue una distribución bimodal: siendo el primer pico durante la infancia y el segundo alrededor de los 50 años¹⁷. La incidencia mundial es de 1-4.75 casos por cada 1000,000 habitantes¹. En la revisión más reciente del SEER¹⁸, la incidencia en Estados Unidos de América es del 1.5 y 1.9 casos por cada 100,000 habitantes en mujeres y hombres, respectivamente. La incidencia en población hispana es más alta, siendo del 2.0 y del 2.8 casos por cada 100,000 habitantes en mujeres y hombres, respectivamente. La tasa de mortalidad global es del 0.4 y 0.5 casos por cada 100,000 habitantes en mujeres y hombres, respectivamente. La tasa de mortalidad más elevada se encuentra en la comunidad hispana con 0.6 y 0.8 casos por cada 100 000 habitantes en mujeres y hombres, respectivamente. El desenlace de esta enfermedad ha mejorado considerablemente en las últimas cuatro décadas, con un aumento de supervivencia global a 5 años del 31% en 1975 a casi el 70% en 2009. Sin embargo, estos resultados esconden una gran disparidad por grupo etario: a pesar de una supervivencia global a 5 años del 90% en la población pediátrica, en los mayores de 50 años es del 25%^{4,13}. En la población geriátrica, la supervivencia es aún más abrumadora a pesar de la alta tasa de respuesta a la inducción, con una sobrevida a largo plazo solo del 30-40%¹⁹.

En México, las características epidemiológicas de la LLA cambian considerablemente a lo publicado en poblaciones hispanas en otros países. En un estudio en dos centros de referencia de la ciudad de México²⁰, se analizaron 1432 pacientes, de estos 759 con el diagnóstico de LLA. LA media de edad para este subgrupo fue de 33 años, con una distribución homogénea entre ambos géneros (50.6% masculinos), siendo la variedad morfológica L2 de la FAB, la más frecuente. En la ciudad de México, la incidencia de LLA parece ser más alta que en otros países, estimándose 57.6 casos por millón²¹. Las defunciones registradas hasta el año 2001, fueron de 2.6 casos por cada 100 000 habitantes, por lo que se consideró la séptima causa de mortalidad, mientras que para el grupo de 5 a 14 años la incidencia de mortalidad fue de 2.6 casos por cada 100 000 y por ende la segunda causa de mortalidad²².

La literatura actual⁴, indica que durante el desarrollo de los linfocitos participan diferentes vías de señalización que son vitales para su adecuada maduración y proliferación; cuando alguna de estas vías presenta una alteración puede desencadenar alteraciones linfocitarias, las cuales pueden determinar la presencia de la enfermedad, su agresividad, la respuesta al tratamiento y el tiempo de sobrevida de los pacientes. Muchas de estas alteraciones son de orden genético y por ende es importante conocerlas y estudiarlas.

Vía PI3K/ AKT1/ mTOR/ PTEN



“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado”

“Informe de Avances para protocolos de investigación”

El gen que codifica para PI3K (phosphatidylinositol 3-kinas) se conoce como *PIK3CA* (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit Alpha), localizado en el cromosoma 3q26.32. Este gen provee las instrucciones para la codificación de la proteína p110 alpha (p110a), la cual es una subunidad catalítica de la PI3K, por lo tanto regula la actividad de esta enzima²³. En la LLA, debido a los diferentes defectos celulares que presenta, se ha observado que la vía de señalización PI3K/ AKT1/ mTOR/ PTEN se ve alterada, por lo que la proliferación y diferenciación, así como las señales de supervivencia del linfocito B en cualquiera de sus estadios se ve afectada²⁴.

En esta vía la molécula PI3K, ejerce su función como molécula activadora iniciando la señalización celular a partir de la membrana plasmática uniéndose a receptores transmembranales, el sustrato más importante de esta cinasa es el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2), una vez activada fosforila a fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato (PIP3)^{24,25}. El efector principal de PI3K es la cinasa serina/treonina (AKT), la cual se transloca de la membrana al citosol donde fosforila a la molécula mTOR. AKT es el mayor mediador de la supervivencia, metabolismo y migración celular. mTOR al ejercer su función como cinasa, fosforila diversas proteínas claves para la traducción de RNA mensajero, las cuales regulan el crecimiento celular^{24,26}; por otro lado, PTEN es una fosfatasa quien regula a AKT durante su activación²⁷. La desregulación o activación aberrante de estas cascadas metabólicas conllevan a una falla en la proliferación y muerte celular que contribuyen al desarrollo de la leucemia, la vía de PI3K/ AKT/ mTOR esta alterada y activa en la LLA²⁸.

En estas moléculas existen variaciones genéticas llamadas polimorfismos de nucleótido simple (SNPs por sus siglas en inglés, *Single Nucleotide Polymorphisms*), estos se definen como el cambio de una base nucleotídica por otra, se presentan en más del 1% de la población y presentan patrones de herencia que pueden predisponer a un individuo a cierto tipo de patologías como la LLA⁷.

Existen una variación genética específica del gen *PIK3CA* para distintos tipos de cáncer^{29,30}. Las variaciones que se han observado en mayor medida, es el cambio de histidina por arginina en el codón 1047 (H1047R, rs121913279)³¹⁻³³ y la variación de un ácido glutámico por lisina en el codón 545 (E545K, rs104886003), sugiriendo que estos cambios podrían influir en la actividad de cinasa lipídica, incrementando su actividad²⁹.

En el gen de *AKT1* se han documentado variaciones alélicas que modifican la función de su proteína. Una de ellas es un cambio de treonina por prolina en el codón 435 (T435P, rs397514645), que ha demostrado incremento en su actividad funcional; otra variación ocurre por el cambio de una arginina por una cisteína en el codón 25 (R25C, rs397514644), lo que genera que la proteína se active, pero no se una de manera eficiente a los fosfoinosítidos³³.

El gen de *MTOR* presenta dos variaciones localizadas en el mismo codón, la primera es el codón 1483 donde hay un cambio de cisteína por alanina (C1483A, rs786205165), la cual es la de mayor frecuencia y el segundo en el mismo codón, pero es un cambio de cisteína por tirosina (C1483Y)³⁴. Se desconoce su significancia clínica, sin embargo, se han asociado con el desarrollo del Síndrome de Smith Kingsmore, cáncer de riñón, cáncer de mama y glioblastoma. La segunda



“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado”

“Informe de Avances para protocolos de investigación”

variación se localiza en el codón 1779 el cual es un cambio de ácido glutámico por lisina (E1779K, rs863225264) sin embargo, no se ha determinado la función biológica³⁵.

Los polimorfismos en el gen de *PTEN*, son el rs121909222 que es un cambio de histidina por arginina en el codón 123 (H123R) y el rs121909223 con un cambio de cisteína por arginina o cisteína por glicina en el codón 124 (C124R, C124G), los cuales producen una pérdida en la actividad como fosfatasa³⁶.

Gen de *IKZF1*

Otra de las moléculas más estudiadas en el desarrollo de LLA es el factor de transcripción llamado Ikaros, que participa en el desarrollo del sistema hematopoyético y es clave en la regulación de la diferenciación de los linfocitos, ya que actúa en la remodelación de la cromatina; se ha observado que en los estadios tempranos de la linfopoyesis de células B, Ikaros es indispensable³⁷⁻³⁹.

El gen de *IKZF1* que codifica para la proteína Ikaros, tiene la función de dedos de zinc al unirse a la secuencia de DNA que será transcrita, este gen presenta una delección la cual conlleva a la falla de la unión al DNA y genera linfocitos inmaduros. Una disminución en la actividad de Ikaros causa una rápida acumulación de linfocitos T y su posterior transformación neoplásica en LLA de linfocitos T^{40,41}.

IKZF1 tiene distintos polimorfismos, uno es el rs4132601 (G/ T) y el segundo es el rs11980379 (C/ T), ambos se localizan en la región no codificante 3' (UTR3'). En un estudio realizado en población francesa determinaron que el rs4132601 (OR=1.6; CI_{95%}=1.3-1.9, p<5x10) está asociado al desarrollo de LLA-B, los pacientes que portan esta variación tienen un mal pronóstico⁴².

Por otro lado, en un estudio llevado a cabo en la población iraní mostró que la variación del rs11980379, en los heterocigotos TC incrementa el riesgo (OR= 2.43, CI_{95%}= 1.28-4.6, P=0.0076), al igual que el alelo C a desarrollar LLA (OR= 1.7, CI_{95%}=1.7-2.46, p=0.0062); en este estudio sugiere que los polimorfismos en *IKZF1* tiene un impacto en el riesgo al desarrollo de LLA, sin embargo sugieren que se requieren mayor análisis para confirmar sus hallazgos⁴³.

El cromosoma Filadelfia (Chr. Ph)

Es generado por una translocación citogenética balanceada con rearreglo de dos cromosomas no homólogos, en el cual, se involucra el brazo largo del cromosoma 9 donde se encuentra el gen *ABL1* y la porción distal del brazo largo del cromosoma 22 donde se encuentra el gen *BCR*, gracias a este intercambio se genera la fusión del gen *BCR/ABL1* [t(9;22) (q34;q11.2)]⁹. El producto del gen *BCR/ABL* codifica para la proteína BCR/ABL1, la cual activa constitutivamente a la proteína tirosin cinasa (PTK por sus siglas en inglés, *Protein tyrosin kinase*), ya que activa las vías de señalización centrales de la regulación del desarrollo linfoide, altera su actividad mitogénica, reduce la posibilidad de realizar apoptosis, además de alterar la adhesión y movilización de células progenitoras. Por lo tanto, debido a la fusión de *loci*, a la proteína codificada se le considera como una oncoproteína, debido a que tiene un papel central en la patogénesis de la leucemia mieloide crónica (CML), así como en algunos tipos de LLA^{4,10,44}.

El punto de ruptura dentro del cromosoma 22 del gen *BCR* presente en CML se ubica entre los exones 12 y 16, conocida como la “región de punto de quiebre mayor” (M-BCR fragmento mayor de *BCR*), las translocaciones que involucran el M-BCR produce una proteína BCR/ABL1 de mayor tamaño denominada p210, debido a su peso molecular de 210 kDa. Las translocaciones que se presentan en la LLA son menores (m-BCR fragmento menor del gen *BCR*) y se ubican solamente en el primer exón de *BCR*, esta genera un producto proteico de 190 kDa conocido como p190. De las proteínas p210 y p190, la que posee mayor capacidad transformante es el tipo “LLA” p190 presentándose en aproximadamente el 90% de los pacientes pediátricos con Ph+ LLA⁴⁴

La presencia del gen de fusión *BCR/ABL* en pacientes con LLA (Ph+ LLA) poseen un pronóstico adverso asociado a falla terapéutica con 10% menos posibilidades de remisión completa que Ph negativo y con una media de sobrevida de 8 meses⁴⁵. La frecuencia de la t(9;22) aumenta con la edad: en los pacientes pediátricos con LLA solo se encuentra del 3-5%, mientras que en el adulto es más común y se encuentra en el 25-40% de los casos³. En general el presentar la translocación con fusión del gen *BCR/ABL* representa un criterio de mal pronóstico³, usualmente el seguir con el tratamiento estándar de quimioterapia y trasplante autólogo subsecuentemente, la sobrevida mayor a 5 años no es alcanzada mas que en el 5-10%⁴⁶ y aumenta hasta 60% con tratamiento a base de hyper-CVAD (ciclofosfamida, vincristina, doxorribisina [adriamicina], dexametasona, con rituxan)⁴⁷. Modificaciones más recientes al régimen de hyper-CVAD incluyen la adición de Imatinib (inhibidor selectivo de PTK en *BCR/ABL 1*) a pacientes con presencia de gen Filadelfia positivo, lo cual ha mejorado la sobrevida de los pacientes con una remisión completa (CR por sus siglas en inglés, *Complete Remission*) del 95%, pero solo con una sobrevida mayor a 5 años de 12%⁴⁷.

Existen nuevos inhibidores de tirosin cinasas para pacientes con CML y LLA con Ph+ los cuales se utilizan debido a la resistencia que genera el uso prolongado de Imatinib, como lo son el Nilotinib y Dasatinib. El Nilotinib es un inhibidor de alta afinidad y selectividad a la cinasa de ABL, en un estudio en pacientes Ph+ LLA el 24% respondieron de manera satisfactoria⁴⁸, por otro lado el Dasatinib, que es más potente que el Imatinib, es un inhibidor de las cinasas de BCR/ABL, c-KIT y la familia de SRC (grupo de proteínas de tirosin cinasas, proto-oncogen)⁴⁹; en un estudio italiano del Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell’Adulto (GIMEMA) observó que posterior a la administración de prednisona 7 días previos a la administración de Dasatinib el 100% de los pacientes mejoraron y presentaron una respuesta hematológica completa. Pese a que Nilotinib y Dasatinib tienen una clara actividad en Ph+ LLA, los resultados obtenidos son similares a Imatinib en cuanto a la duración de los efectos, ya que el paciente desarrolla resistencia, por lo que actualmente se está estudiando un régimen con el uso combinado de estos⁵⁰.

Los pacientes que padecen Ph+ LLA , como se ha mencionado anteriormente, presentan diferentes tipos de respuestas a la quimioterapia, lo que se debe principalmente por diferencias genéticas concomitantes, como lo son las aberraciones cromosómicas, ya sea cambios adicionales epigenéticos, anormalidades de número de copias, o mutaciones, las cuales son comúnmente encontradas y poseen un impacto negativo en el pronóstico de la patología. Esto se observó cuando se compararon dos cohortes de pacientes donde evaluaron la sobrevida a 5 años entre pacientes portadores de Ph+ y pacientes portadores Ph+ más algunas otras anormalidades genéticas secundarias, se encontró que en el primer grupo obtuvieron un mejor porcentaje de



“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado”

“Informe de Avances para protocolos de investigación”

sobrevida mayor a 5 años (86 ± 10 vs 51 ± 11)⁵¹. A nivel molecular una de las aberraciones más frecuentes es la delección o falta de función del gen *IKZF1*, el cual es un regulador del desarrollo linfóide normal, el cual ocurre en el 70-80% de los casos de PH+ LLA⁵² y está altamente asociado a un pronóstico desfavorable^{53,54}. Estas alteraciones de *Ikaros* son más frecuentes en leucemias linfoides B que en las linfoides T⁴⁴.

A pesar de lo anteriormente descrito, poco se ha estudiado en relación de estos marcadores moleculares y el desarrollo de LLA-B en población mexicana mestiza, por lo cual es importante conocer como participan en esta patogenia y posible

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Los marcadores genéticos, previamente descritos, contribuyen en la predisposición y presentación de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B en pacientes mexicanos mestizos del CMN “20 de Noviembre”?

8. JUSTIFICACIÓN.

Según la Agencia de Investigación Internacional de Cáncer (por sus siglas en inglés IARC) en su base de datos de incidencia de cáncer en los cinco continentes (CI5-volumen X) el cual abarca del año 2003 al 2007, la LLA abarca menos del 1% de cáncer en adultos, es el más común durante la infancia, ya que se presenta hasta en un 25% de todos los tipos de cáncer y hasta un 80% de las leucemias¹⁶.

En EUA los casos estimados para el 2017 son de 5,970, de los cuales hasta el 0.4% presentan todos los tipos de cáncer con una mortalidad estimada en 1,440 representando el 0.2% de todas las muertes por cáncer¹⁸ (SEER, 2010-2014); la tasa de incidencia más alta corresponde a la comunidad hispana con 2.7 casos en hombres y 2.2 casos en mujeres por cada 100 000 habitantes. La tasa de mortalidad más elevada se encuentra en la comunidad hispana con 0.8 y 0.6 casos por cada 100 000 habitantes en hombres y mujeres respectivamente.

En la ciudad de México, la incidencia de LLA parece ser más alta que en otros países, estimándose 57.6 casos por millón²¹. Las defunciones registradas hasta el año 2001, fueron de 2.6 casos por cada 100 000 habitantes, por lo que se consideró la séptima causa de mortalidad, mientras que para el grupo de 5 a 14 años la incidencia de mortalidad fue de 2.6 casos por cada 100 000 y por ende la segunda causa de mortalidad²².

En la LLA-B intervienen diversos trastornos de orden genético, en donde los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) probablemente influyen en el desarrollo de las variantes clínicas, su pronóstico y/o respuesta al tratamiento. Por lo que el conocer la correlación de los SNPs, nos ayudará a comprender porque existe una alta incidencia en la población mexicana mestiza, además de definir marcadores genéticos asociados con la susceptibilidad, desarrollo y/o protección de esta patología. Así mismo, conocer la asociación de la presencia del Chr. Ph+ junto con la presencia de los SNPs, nos hará comprender y realizar asociaciones en cuanto a la respuesta al tratamiento y su posterior evolución, además de contribuir en la calidad de vida del paciente.



“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado”

“Informe de Avances para protocolos de investigación”

9. HIPÓTESIS.
Los polimorfismos de los genes *PIK3CA*, *AKT1*, *MTOR*, *PTEN* e *IKZF1* se encuentran asociados con el desarrollo y variabilidad de presentación de LLA-B en población mestiza mexicana.

10. OBJETIVO GENERAL.
Determinar la frecuencia génica y alélica de los polimorfismos en los genes de *PIK3CA*, *AKT1*, *MTOR*, *PTEN* e *IKZF1* en pacientes con LLA-B y controles clínicamente sanos, y determinar su correlación con la presencia de cromosoma Philadelphia, en el desarrollo, susceptibilidad y/o protección a Leucemia Linfoblástica Aguda de células B en la población mexicana mestiza.

11. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Generar un acervo a partir de las muestras de DNAm y RNAm obtenida tanto de los pacientes mestizos mexicanos con LLA-B, así como de los Controles Clínicamente Sanos (CCS-donadores de banco de sangre).
- Tipificar las muestras de pacientes y CCS para los diferentes polimorfismos de *PIK3CA* (rs104886003, rs121913279), *AKT1* (rs397514645, rs397514644), *MTOR* (rs786205165, rs863225264), *PTEN* (rs121909222, rs121909223) y *IKZF1* (rs4132601, rs11980379).
- Determinar en pacientes y CCS, la frecuencia alélica de cada uno de los polimorfismos en los genes de *PIK3CA* (rs104886003, rs121913279), *AKT1* (rs397514645, rs397514644), *MTOR* (rs786205165, rs863225264), *PTEN* (rs121909222, rs121909223) y *IKZF1* (rs4132601, rs11980379).
- Asociar la frecuencia alélica de cada uno de los polimorfismos en los genes de *PIK3CA* (rs104886003, rs121913279), *AKT1* (rs397514645, rs397514644), *MTOR* (rs786205165, rs863225264), *PTEN* (rs121909222, rs121909223) y *IKZF1* (rs4132601, rs11980379), con el desarrollo, susceptibilidad y/o protección a LLA-B en población mestiza mexicana.
- Realizar mediante kit de citometría de flujo el análisis de activación de la vía PI3K/AKT/MTOR con la presencia de los polimorfismos encontrados.
- Tipificar las muestras de los pacientes con LLA la presencia del Chr Ph+ mediante PCR en tiempo real.
- Asociar la presencia de polimorfismos con la presencia del Chr. Ph+ en los pacientes con LLA de linfocitos B.

12. METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION

12.1 Diseño y tipo de estudio.
Transversal analítico.

12.2 Población de estudio.



“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado”

“Informe de Avances para protocolos de investigación”

Pacientes que presenten leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B y en un grupo de controles clínicamente sanos (CCS, donadores de banco de sangre), mexicanos mestizos.

12.3 Universo de trabajo

Pacientes de cualquier sexo con Leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B diagnosticados por un especialista, que cuenten con un expediente clínico completo del CMN “20 de Noviembre”. Debido a que es un estudio pareado se incluirá un grupo de control clínicamente sano tomado del banco de sangre del instituto, del mismo género y edad, de lo que los pacientes.

Los candidatos (pacientes y controles) serán invitados a participar en el estudio por medio de una invitación verbal y escrita de los objetivos de investigación, así como lo que implica su participación en ella, posteriormente si aceptan se les pedirá firmar un consentimiento, (Anexo I y II) y se les realizará un cuestionario de ancestría (Anexo III).

El cuestionario de ancestría (Anexo III) nos servirá para conocer la etnicidad de la población a estudiar, ya que tanto pacientes como controles son clasificados como mexicanos mestizos, los cuales son definidos como aquellos individuos nacidos en México que tienen un apellido derivado del español, con ancestros nacidos por lo menos tres generaciones en México, los mestizos son el resultado de 500 años de mezcla entre individuos españoles, amerindios y africanos, por lo que hoy en día son los que representan la mayoría de la población mestiza mexicana (>90%) (Rangel-Villalobos, 1966; Rubí-Castellanos, 2009).

12.4 Tiempo de ejecución.

Dos años a partir de la aprobación de los diferentes comités del CMN “20 de Noviembre”.

12.5 Esquema de selección.

12.5.1 Definición del grupo control.

Individuos clínicamente sanos que acepten el ingreso al protocolo de estudio y hayan llenado correctamente un cuestionario de ancestría e historial clínico sin antecedentes familiares de cualquier tipo de cáncer, enfermedades autoinmunes y que por definición sean mestizos mexicanos.

12.5.2 Definición del grupo a intervenir.

Pacientes mestizos mexicanos con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B captados en la consulta del Servicio de Hematología en el CMN “20 de Noviembre”.

12.5.3 Criterios de inclusión.

Ser mestizo mexicano.

Con diagnóstico confirmado de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B.

Ser paciente del Servicio de Hematología del CMN “20 de Noviembre”.

Firmar cartas de consentimiento informado y de protección de datos para la inclusión a este protocolo.

12.5.4 Criterios de exclusión.



“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado”

“Informe de Avances para protocolos de investigación”

Aquellos pacientes que no cumplan con los criterios de inclusión.
 Aquellos pacientes que presentes otro tipo de cáncer o tumoración.
 Aquellos pacientes que no hayan firmado la carta de consentimiento informado y/o el aviso de privacidad.
 Aquellos pacientes que presenten enfermedades infecciosas como VIH.

12.5.5 Criterios de eliminación.

Todo aquel paciente que no desee continuar en el protocolo de investigación o que reúsen el continuar con el mismo.

Aquellos pacientes que no tengan expedientes completos.
 Todas aquellas muestras que por motivo de toma de muestra o inherente a esta, no puedan procesarse adecuadamente.

12.6 Tipo de muestreo.

12.6.1 Muestreo probabilístico.

No aplica.

12.6.2 Muestreo no probabilístico.

Muestreo por conveniencia.

12.7 Metodología para el cálculo del tamaño de la muestra y tamaño de la muestra.

El reclutamiento será por conveniencia por cuestiones de logística, se espera el contar con 100 muestras de pacientes con LLA-B y 100 muestras de individuos clínicamente sanos.

12.8 Descripción operacional de las variables.

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLES	VARIACIÓN
Sexo	Conjunto de características biológicas, físicas, fisiológicas y anatómicas que definen a los seres humanos como hombre y mujer.	Referido por interrogatorio.	Cualitativa Dicotómica	Masculino Femenino
Edad	Tiempo que ha vivido una persona u otro ser vivo contando desde su nacimiento.	Fecha actual – Fecha de nacimiento.	Cuantitativa Continua	Años
Marcador genético <i>IKZF1</i>	Gen que codifica para el factor de transcripción Ikaros, quien juega un rol principal como regulador de hematopoyesis	Alelos, genotipos y haplotipos	Cualitativa	Presencia o ausencia

	(Término MeSH: Ikaros transcription factor, 2006)			
Marcador genético <i>PIK3CA</i>	Gen que codifica para la proteína fosfatidil 3 kinasa que cataliza la conversión de 1 fosfatidilinositol a 1 fosfatidilinositol 3 fosfato (término MeSH: Phosphatidylinositol 3-Kinases, 2011)	Alelos, genotipos y haplotipos	Cualitativa	Presencia o ausencia
Marcador genético <i>AKT1</i>	Gen que codifica para la proteína kinasa de protein-serina, el cual posee dominios homologos de pleckstrina que son activados por fosforilación en respuesta a factores de crecimiento o insulina (término MeSH: AKT1, 2005)	Alelos, genotipos y haplotipos	Cualitativa	Presencia o ausencia
Marcador genético <i>MTOR</i>	Gen que codifica para la proteína blanco de rapamicina en mamíferos, la cual es una serina en treonina que controla un amplio espectro de procesos celulares (término MeSH: TOR serine-Threonine Kinases, 2011)	Alelos, genotipos y haplotipos	Cualitativa	Presencia o ausencia
Marcador genético <i>PTEN</i>	Gen que codifica para la proteína homóloga de fosfatasa y tensina, la cual es una fosfatasa lipídica que contiene dominios C2 y actúa sobre PIP3 y regula varias vías de transducción. Modula procesos de crecimiento, migración, y apoptosis (término MeSH: PTEN	Alelos, genotipos y haplotipos	Cualitativa	Presencia o ausencia



“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado”

“Informe de Avances para protocolos de investigación”

	Phosphohydrolase, 2006).			
Marcador de Chr. Ph+ de LLA (p190)	Producto de traducción de la fusión de un gen derivado de la translocación cromosómica de los genes <i>BCR/ABL</i> al locus genético del punto de quiebre del gen en el cromosoma 22 (término MeSH: Fusion Proteins, <i>bcr/abl</i> , 1991).	Presencia del RNA mensajero	Cualitativa	Presencia o ausencia
12.9 Técnicas y procedimientos a emplear.				
Cada uno de los procedimientos se realizarán tanto en la cohorte de pacientes y en los controles clínicamente sanos (CCS):				
Procedimiento para la toma de muestra sanguínea				
Previa asepsia y antisepsia de la región a puncionar con torundas con alcohol, se aplicará torniquete de manera proximal con ligadura en brazo seleccionado, se puncionará con aguja Vacutainer (BD Biosciences, NJ, USA) 0.8 x 38 en la vena mediana o cefálica, se extraerá sangre por presión negativa en tres tubos con anticoagulante (EDTA), cada uno de los tubos con un volumen de 5ml.				
Las muestras se procesarán de la siguiente manera: a) el primer tubo se utilizará para la determinación de la activación de la cascada de señalización de PI3K por citometría de flujo; b) en la segunda muestra se utilizará para la tipificación de los marcadores genéticos; y c) a partir del tercer tubo se extraerá RNA mensajero para la determinación del cromosoma Filadelfia.				
Formación de acervo de muestras:				
a) Extracción de DNA genómico (gDNA)				
A partir de la muestra tomada en el tubo con anticoagulante, será procesada para extraer gDNA mediante la técnica modificada de Miller (Miller, 1988). Se determinará la concentración de gDNA para lo que se tomará 1 µL de la muestra y se determinará la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (longitud de onda para ácidos nucleicos) y 280 nm (longitud de onda para proteínas) en por medio de un NanoDrop 2000c/2000 UV-Vis espectrofotómetro (Thermo Scientific). La relación gDNA/proteínas (A260/A280), debe ser de 1.8 a 2.0, para determinar que efectivamente no exista contaminación excesiva por proteínas. Finalmente se prepararán diluciones de gDNA a una concentración final de 20 ng/µL en un volumen final de 200 µL, las cuales se almacenarán a -20°C hasta su uso. NO se requiere hacer ningún corrimiento de geles teñidos con agentes intercalantes para determinar integridad del gDNA.				

b) Extracción de RNA mensajero (RNAm)

Para cada muestra de pacientes se añadirá 1 ml de TriPure por cada 100 mg de sangre periférica, se homogeniza para dejar incubar a 15 a 25°C por 5 minutos para disociar los complejos nucleoproteicos. Posteriormente se añade cloroformo a razón de 0.2 ml por cada 1ml de TriPure y se agita vigorosamente 15 segundos e incubarlo de 15 a 25°C durante 2 a 15 minutos. Se centrifuga a 12,000 x g por 15 min a 2 a 8°C. Se obtiene el tubo de muestra posterior al centrifugado donde se observan tres fases, se obtiene la fase superior o acuosa que es la que contiene el RNA. Se trasfiere la fase acuosa a un nuevo tubo, para después precipitar con isopropanol a razón de 0.5 ml por cada ml de TriPure y se mezcla por inversión; se incuba de 15 a 25°C por 5 a 10 minutos. Se centrifuga a 12,000 x g por 10 minutos a 2 a 8 °C y se desecha el sobrenadante, posteriormente se lava el botón con alcohol etílico a razón de 1 ml por cada mililitro de TriPure, se deja secar y se resuspende en agua libre de ARN-asas o con DEPC y se incuba a 55 a 60°C por 10 a 15 minutos y se resuspende. Se almacenará a -15 a-25°C, hasta su análisis.

Determinación de marcadores moleculares

A partir del acervo de DNAg se hará genotipificación de los polimorfismos en los genes de *IKZF1* (rs4132601, rs11980379), *PIK3CA* (rs104886003, rs121913279), *AKT1* (rs397514645, rs786205165), *PTEN* (rs121909222, rs121909223), *MTOR* (rs786205165, rs863225264) se utilizará la metodología de la técnica de PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan (Pre-Designed SNP Genotyping Assays, Life Technologies, Applied Biosystems, California USA) la amplificación de realizará en el equipo StepOnePlus Real Time PCR Systems (Life Technologies, Applied Biosystems, California, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. La mezcla de reacción contendrá 0.125 µl de sonda TaqMan, 2.5 µl de MasterMix y 5.37 µl de agua MiliQ; además la optimización del ensayo TaqMan se realizará usando controles cuyos genotipos son conocidos por secuenciación. Todos los polimorfismos se realizarán con las mismas condiciones de reacción (una etapa de un ciclo a 60°C por 30 segundos, una segunda etapa de un ciclo a 91°C por 10 min, una etapa 3 de 40 ciclos: 95°C por 15 minutos, 60°C por un minuto y un ciclo final a 60°C por 30 segundos.

Determinación de la activación de la cascada de PI3K/AKT/mTOR/PTEN

Para cada muestra de células se añadirá 5µl 20x de proteína S6 anticuerpo monoclonal conjugado anti-fosforibosomal (Ser235) con PerCP y 5µl de anticuerpo monoclonal conjugado Alexa Fluor 488 Antifosfo-AKT (Ser 473) a 90µl 1x de buffer de ensayo para un volumen final de 100µl. Se dejará incubar en la oscuridad sobre hielo durante una hora. Posteriormente junto con las muestras de ensayo se preparará una tinción de anticuerpo único tanto para proteína S6 anti-fosforibosomal (Ser235) y anti- fosfo-Akt (Ser473) mediante la preparación de 5 µl de anticuerpo 20x en 95 µl de buffer de ensayo 1x para cada 250,000 células. Estas muestras ayudarán a establecer la compensación para las muestras teñidas. Se dejará incubar por lapso de 1 hora sobre hielo. Después de una hora de incubación, por cada célula añadir 500 µl de buffer de ensayo 1x y colocar el tubo del ensayo que contiene células en un centrifugador a 4°C y centrifugar por 5 minutos a 400G; aspirar el sobrenadante y desecharlo de acuerdo con las normas, reservar el precipitado celular. Posteriormente por cada millón de células, añadir suavemente 500 µl de buffer de ensayo 1x para interrumpir el gránulo celular. Pipetear asegurando una adecuada integración. Centrifugar de nuevo a 4°C por 5 minutos a 400G. Al completarse la etapa de lavado, resuspender



“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado”

“Informe de Avances para protocolos de investigación”

el sedimento celular a 0.5×10^6 por ml de buffer de ensayo 1x. Realizar el análisis por citometría de flujo.

Determinación de Cromosoma Filadelfia (gen *BCR-ABL1*)

A partir de las muestras se incuba $1 \mu\text{g}$ de RNA total en $10 \mu\text{l}$ de agua a 70°C por 10 minutos, posteriormente se enfría en hielo y se añaden: 100 U de transcriptasa reversa, buffer RT (dependiendo de lo utilizado con la transcriptasa reversa), 1mM de dNTP, 10 mM de DTT, $25 \mu\text{M}$ de hexámeros aleatorios, y 20 U de inhibidor de RNasas para una volumen final de $20 \mu\text{l}$; se incuba primero a temperatura ambiente por 10 minutos, posteriormente a 42°C por 45 minutos y a 99°C por 3 minutos; se coloca la muestra a 4°C y se diluye con $30 \mu\text{l}$ de agua para su posterior tipificación por medio de la técnica de PCR en tiempo real.

12.10 Procesamiento y análisis estadístico.

Los datos se analizarán en el paquete estadístico SPSS versión 24. Los datos se presentarán en medias y desviación estándar o mediana y percentiles en el caso de las variables cuantitativas y en frecuencias y porcentaje en el caso de las variables cualitativas. Para la comparación de los grupos respecto a las variables cuantitativas se utilizará la prueba T-Student para muestras independientes en caso de que las variables tengan distribución normal, en caso contrario se utilizará la prueba de U-Mann-Withney. En el caso de las variables cualitativas se utilizará la prueba de chi cuadrada de Pearson. Para evaluar los riesgos (OR) de los alelos de *IKZF1*, *PIK3CA*, *AKT1*, *MTOR*, *PTEN* y *BCR-ABL* (Cromosoma Philadelphia), se utilizará un modelo de regresión logística, además se ajustarán los riesgos de acuerdo con las variables potencialmente confusoras. Se tomarán como diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0.05$ e intervalo de confianza al 95%.

13. PRUEBA PILOTO (SI ES EL CASO).

No aplica

14. ASPECTOS ÉTICOS.

1. De acuerdo con la Ley General de Salud en materia de Investigación en Salud, se trata de una investigación de riesgo mínimo.
2. Se someterá a revisión en el Comité de Ética, Investigación y Bioseguridad del CMN “20 de Noviembre” para su aprobación.
3. Los pacientes firmarán una carta de consentimiento informado previo a la inclusión del estudio, en donde se les explicará el propósito, los beneficios y riesgos que podrían presentarse en el curso de la investigación, así como también se les informará de sus derechos y responsabilidades al momento de estar incluidos.
4. La decisión de participar en el estudio es responsabilidad solamente de los pacientes o controles, así como de retirarse del estudio cuando así lo deseen, su decisión no afectará de



“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado”

“Informe de Avances para protocolos de investigación”

ningún modo la atención que reciben en el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE.

5. Los datos recabados se mantendrán de manera confidencial, los datos solo serán manejados por el investigador principal y los investigadores involucrados en el presente protocolo de Investigación del CMN “20 de Noviembre”. En la recolección de datos personales se siguen todos los principios que marca la ley Federal de Protección de Datos: Licitud, calidad, consentimiento, información, finalidad, lealtad, proporcionalidad y responsabilidad. Se han implementado las medidas de seguridad, técnicas, administrativas y físicas necesarias para proteger los datos personales y evitar daño, pérdida, alteración, acceso o tratamiento no autorizado (Anexo IV). Toda la información proporcionada se utilizará con fines de investigación y conforme al consentimiento informado (Anexo I y II).
6. Los investigadores confirmamos que la revisión de los antecedentes científicos del proyecto justifican su realización, que contamos con la capacidad para llevarlo a buen término, nos comprometemos a mantener un estándar científico elevado que permita obtener información útil para la sociedad, a salvaguardar la confidencialidad de los datos personales de los participantes en el estudio, pondremos el bienestar y la seguridad de los pacientes sujetos de investigación por encima de cualquier otro objetivo, y nos conduciremos de acuerdo a los estándares éticos aceptados nacional e internacionalmente según lo establecido por la Ley General de Salud, Las Pautas Éticas Internacionales Para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos de la Organización Mundial de la Salud, así como la Declaración de Helsinki.

14.1 Consentimiento informado.

Se anexa formato tanto para pacientes como para controles (Anexo I y II).

14.2 Conflicto de intereses.

Los investigadores declaran que no hay conflicto de intereses.

15. CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD.

Los procedimientos no alteran el procedimiento médico de diagnóstico o tratamiento del paciente que se haría de rutina, y están basados en la mejor práctica clínica. La toma de muestras durante el estudio se realizará en apego al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, respetando aspectos de tomar las medidas pertinentes para evitar cualquier riesgo o daño a los sujetos de investigación.

Las muestras biológicas serán adquiridas por personal experto, y serán adecuadamente identificadas, contenidas y almacenadas. Su análisis y determinaciones se realizarán de acuerdo a las buenas prácticas de laboratorio. Posteriormente se tratarán y se eliminarán en bolsas apropiadas para su disposición.

Para cumplir con lo establecido en las disposiciones de la fracción 6 de la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 Residuos Biológico-Infeciosos.



“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado”

“Informe de Avances para protocolos de investigación”

16. RECURSOS.
16.1 RECURSOS HUMANOS.
<p>Dra. Martha Leticia Alvarado Ibarra – Hematología/ Investigador principal Dra. Mónica Escamilla Tilch – Investigador principal Dra. Rebeca Perez Cabeza de Vaca – Investigador adjunto Dr. Juan Antonio Pineda Juárez – Investigador adjunto Dr. Paul Mondragon Terán – Investigador adjunto Dr. Juan Pablo Macías Flores - Investigador adjunto</p>
16.2 RECURSOS MATERIALES.
<p>Equipo de laboratorio especializado: Centrifuga refrigerada, ultracongelador, termociclador, equipo de tiempo real, citómetro de flujo. Insumos de laboratorio: Tubos con EDTA, agujas de Vacutainer®, reactivos zonas TaqMan. Software especializado: SPSS Computadoras Impresoras</p>

16.3 RECURSOS FINANCIEROS.
Se solicitará apoyo a EO15-2017 (ISSSTE)

17. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

Actividades.	Enero- Abril 2017	Mayo- Sep 2017	Oct-Dic 2017	Enero- Abril 2018	Mayo- Ago 2018	Sept- Dic 2018	Enero- abril 2018
Selección del tema de investigación.	X						
Búsqueda de información bibliográfica.	X						
Elaboración, revisión y aprobación del protocolo de investigación y comités.		X					
Captación de pacientes.			X	X	X		
Explicación del estudio y firma de la carta de consentimiento informado.			X	X	X		
Inicio del estudio.			X				



“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado”

“Informe de Avances para protocolos de investigación”

Extracción de DNA			X	X	X		
Tipificación de DNA			X	X	X		
Final del estudio experimental.						X	
Análisis de resultados.							X
Elaboración de tesis.							X
Elaboración de artículos de investigación.							X
Presentación del trabajo en congresos Nacionales o Internacionales						X	X

18. RESULTADOS ESPERADOS Y PRODUCTOS ENTREGABLES.

Tesis de posgrado.
 Artículos de investigación en revistas indexadas nacionales y/o internacionales.
 Presentación del trabajo en congresos nacionales e internacionales.

19. APORTACIONES O BENEFICIOS GENERADOS PARA EL INSTITUTO.

El propósito de este estudio es determinar marcadores genéticos y/o biomarcadores característicos para la población mexicana mestiza que presenten LLA-B, los cuales puedan utilizarse para diagnóstico, tratamiento y/o seguimiento a partir de los genes a analizar (*IKZF1*, *PIK3CA*, *AKT1*, *MTOR*, *PTEN*, *BCR/ABL1*).

Además de la formación de recursos humanos y de nuevas líneas de investigación de las cuales se pueda generar artículos en revistas indexadas.

De tal manera que todos los productos generados puedan ser utilizados y aplicados para el beneficio del desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico para los derechohabientes del C.M.N. “20 de Noviembre”.

20. PERSPECTIVAS.

1. Generar nuevas líneas de investigación.
2. Formación de recursos humanos altamente capacitados.
3. Generar las bases para la aplicación demarcadores genéticos en el diagnóstico y/o tratamiento de diversas enfermedades.

21. DIFUSIÓN.



“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado”

“Informe de Avances para protocolos de investigación”

Los resultados obtenidos se difundirán en congresos tanto nacionales como internacionales, así como en la publicación de revistas nacionales y/o extranjeras indexadas.

22. PATROCINADORES.	
Nombre del Fondo	Presupuesto interno por E-015 y futura participación en convocatorias para recursos de CONACYT
Nombre del Laboratorio	
Nombre de la Institución u Organismo	

23. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.
<ol style="list-style-type: none"> 1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2017. pp. 130–49. 2. ACS, American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016. Fecha de consulta febrero 2017. Disponible en http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf. 3. NCCN, National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology: Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 5.2017. National Comprehensive Cancer Network; 2017. 4. Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 2020; 395: 1146–62. 5. Bennet J, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton D, Gralnick H, Sultan C. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French- American- British (FAB) Co-operative Group. British Journal of Haematology 1976, 33(4):451-458. 6. Foon KA, Billings RJ, Terasaki PI, Cline MJ. Immunologic Classification of Acute Lymphoblastic Leukemia Implications for Normal Lymphoid Differentiation. Blood, 1980; 56(6): 1120–1126. 7. Brisson G, Alves L, Pombo de Oliveira M. Genetic susceptibility in childhood acute leukemias: a systematic review. E Cancer, 2015, 9:539. 8. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. Nature 2007; 446: 758–764. 9. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa Staining. Nature. 1973, 243:290-3. 10. Kang ZJ, Liu YF, Xu LZ, Long ZJ, Huanf D, Yang Y, et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. Chin J Cancer, 2016; 35:48. 11. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia. Mediterr J Hematol Infect Dis 2014; 6(1): e2014073. 12. Bertacchini J, Heidari N, Mediani L, Capitani S, Shahjehani M, Ahmadzadeh A, Saki N. targeting PI3K/AKT/mTOR network for treatment of leukemia. Cell. Mol. Life Sci. 2015, 72:2337-2347 13. Martinelli G, Iacobucci I, Storlazzi CT, et. al. IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate

- of cumulative incidence of relapse: A GIMEMA AL WP report. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 5202-7.
14. Davis KL. Ikaros: master of hematopoiesis, agent of leukemia. *Ther Adv Hematol.* 2011;2:359-68.
 15. Rubi-Castellanos R, Anaya-Palafox M, Mena-Rojas E, Bautista-España D, Muñoz-Valle JF, Rangel-Villalobos H. Genetic data of 15 autosomal STRs (Identifier kit) of three Mexican Mestizo population samples from the States of Jalisco (West), Puebla (Center), and Yucatan (Southeast). *Forensic science international Genetics,* 2009; 3:e71-76.
 16. Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, Steliarova-Foucher E, Swaminathan R and Ferlay J, editors (2013). *Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X* (electronic version). Lyon: International Agency for Research on Cancer. Disponible en: <http://ci5.iarc.fr>. Consultado: Febrero 2017.
 17. Paul S, Kantarjian H, Jabbour EJ. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clin Proc* 2016; 91: 1645–1666.
 18. SEER, Sureillance, Epidemiology, and End Results Program, National Cancer Institute, del Programa de Investigación y Vigilancia. Página web, consultado el 2 mayo 2017. Disponible en: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/aly1.html>.
 19. Jabbour E, O'Brien S, Konopleva M, Kantarjian H. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2015; 121: 2517–2528.
 20. Santoyo A, Ramos CO, Saavedra A, González L, Martínez A, Olarte I, Collazo J. Frecuencias de edad y género de pacientes con leucemia observada en dos centros de referencia del Valle de México. *Gac Med Mex.* 2016; 152:208-12
 21. Pérez- Saldivar ML, Fajardo- Gutiérrez A, Berlández- Ríos R, Martínez- Ávalos A, Medina Sansón A, Espinosa- Hernández L. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer* 2011; 11:355.
 22. SSA, Base de datos de defunciones INEGI/ Secretaría de Salud. Dirección General de Información de Salud, CONAPO, 2012. *Proyecciones de la Población de México, 2010-2050.*
 23. CellSignal, PI3K pathway, 2007 pagina web: <https://www.cellsignal.com/contents/science-pathway-research-pi3k-akt-signaling-resources/pi3k-akt-signaling-pathway/pathways-akt-signaling#sthash.gu5mnbYu.dpuf> fecha 22 de marzo 2019.
 24. So L, Fruman D, PI3K Signaling in B and T Lymphocytes: New Developments and Therapeutic Advances. *Biochem J.* 2015, 422(3):465-481.
 25. Lemmon M. Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides. *Biochem Soc Symp,* 2007;(74):81-93.
 26. Brenner A, Andersson T, Bruserud O. The Complexity of Targeting PI3K- Akt- mTOR Signalling in Human Acute Myeloid Leukaemia: The Importance of Leukemic Cell Heterogeneity, Neighbouring Mesenchymal Stem Cells and Immunocompetent Cells. *Molecules.* 2016, 21, 1512:1-32.
 27. Browne CD, Del Nagro CJ, Cato MH, Dengler HS, Rickert RC. Suppression of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate production is a key determinant of B cell energy. *Immunity.* 2009; 31:749–760.
 28. Dinner S, Plataniotis LC. Targeting the mTOR Pathway in Leukemia. *Journal of Cellular Biochemistry,* 2016; 117:1745–1752.
 29. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell S, Riggins G, Willson J, Markowitz A, Kinzler K, Vogelstein B, Velculescu V. High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers, *Science,* 2004, 304.
 30. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CS, et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res.* 2004 Nov 1;64(21):7678-81.

31. Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. PIK3A gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene*, 2005, 24: 1477-1480.
32. Lee JH, Huynh M, Silhavy JL, Kim S, Dixon.Salazar T, Heiberg A, Scott E, Bafna V, Hill KJ, Collazo A, Funari V, Russ C, Gabriel S, Mathern GW, Gleeson JG. De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hememegalencephaly. *Nature Genetics*, 2012, 44(8):941-946.
33. Hafner C, López-Knowles E, Luis NM, Toll A, Baselga E, Fernandez-Casado A, Hernández S, Ribé A, Mentzel T, Stoehr R, Hofstaedter, Landhaler M, Vogt T, Pujol RM, Real FX. Oncogenic PIK3CA ,utations occur in epidermal nevi and seborrheic keratoses with a characteristic mutation pattern. *PNAS*, 2007, 104(33): 13450-13454.
34. Smith LD, Saunders CJ, Dinwiddie DL, Atherton AM, Miller NA, Soden SE, Farrow EG, Abdelmoity AT, Kingsmore SF. Exome Sequencing Reveals De Novo Germline Mutation of the Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) in a Patient with Megalencephaly and Intractable Seizures. *Journal of Genomes and Exomes*, 2013; 63-72.
35. Baynam G, Overkov A, Davis M, Mina K, Schofield L, Allcock R, et. Al. A germline MTOR mutation in Aboriginal Australian siblings with intellectual disability, dysmorphism, macrocephaly, and small thoraces. *American Journal of Medical Genetics A*, 2015; 167: 1659-1667.
36. Nelen MR, van Staveren WC, Peeters EA, Hassel MB, Gorlin RJ, Hamm H, et. Al. Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Human Molecular Genetics*, 1997; 6: 1383-1387.
37. Evans T-J, Milne E, Anderson D, Klerk N, Jamieson S, Talseth-Palmer B, Bowden N, Hollidar E, Rudant J, Orsi L, Richardson E, Lavis L, Cathpoole D, Attia J, Armstrong B, Clavel J, Scott R. Confirmation of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Variants, ARID5B and IKZF1, nad Interaction with Parental Environmental Exposures. *PLoS ONE* 9(10):e110255.
38. Kreile M, Rots D, Piekuse L, et al. Lack of association between polymorphisms in genes MTHFR and MDR1 with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014; 15: 9707-11.
39. Linabery A, Blommer C, Spector L, Davies S, Robison L, Ross J. ARID5B and IKZF1 variants, selected demographic factors, and childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the Children's Oncology Group. *Leuk Res*, 2013,37(8):936-942.
40. Churchman L, Qian M, Zhang R, Kroonie G, Yang W, Zhang H, et al. Germline Genetic Variation in IKZF1 and Predisposition to childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*, 2016, 128: LBA-2; 38.
41. Olsson L, Johansson B. Ikaros and leukaemia. *British Journal of Haematology*, 2015, 169, 479–491.
42. Orsi, Rudant J, Bonaventure A, Goujon-Bellec S, Corda E, Evans T-J, Petit A, Bertrand Y, Nelken B, Robert A, Michel G, Sirvent N, Chastagner P, Ducassou S, Rialland X, Hémon D, Milne E, Scott RJ, Baruchel A, Clavel J. Genetic polymorphisms and childhood acute lymphoblastic leukemia: GWAS of the ESCALE study (SFCE). *Leukemia* 2012, 26:2561-2564.
43. Bahari G, Hashemi M, Naderi M, Taheri M. IKZF1 gene polymorphisms increased the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in an Iranian population. *Tumour Biology*, 2016 July; 37(7): 9579-86.
44. Bernt K, Hunger S. Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in Oncology*. 2014. 54(4):1-21.
45. Fielding A. Current Treatment of Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology*. 2011. 231-237.



“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado”

“Informe de Avances para protocolos de investigación”

46. Lee HJ, Thompson JE, Wang ES, Wetzler M. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: current treatment and future perspectives. *Cancer*. 2011.117:1583-1594.
47. Kantarjian H, Thomas D, O'brien S, Cortes J, Giles F, Jeha S. Long term follow up results of hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (Hyper-CVAD), a dose intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2004, 101(12):2788-801.
48. Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wassmann B. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome positive ALL. *N Engl J Med*. 2006, 354(24):2542-51.
49. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R. Dasatinib in imatinib resistant Philadelphia chromosome- positive leukemias. *N Engl J Med*. 2006. 354(24):2531-41.
50. Foa R, Vitale A, Vignetti M. Dasatinib as first-line treatment for adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011, 118(25):6521-8.
51. Schultz KR, Carroll A, Heerema NA, Bowman WP, Aledo A, Slayton WB, Sather H, Devidas M, Zheng HW, Davies SM, Gaynon PS, Trigg M, Rutledge R, Jorstad D, Winick N, Borowitz MJ, Hunger SP, Carroll WL, Camitta B, Children's Oncology Group. Long-term follow-up of Imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group Study AALL0031. *Leukemia*. 2014, 28(7):1467-1471.
52. Mullighan CG, Miller CB, Radke I, Letha AP, Dalton J, Ma J, White D, Hughes T, Beau M, Pui C, Relling M, Shurtleff, S, Downing J. BCR-ABL1 lymphoblastic leukemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*. 2008. 453:110-115.
53. Martinelli G, Iacobucci I, Storlazzi C, Vignetti M, Paoloni F, Cilloni D, Soverini S, Vitale A, Charetti S, Cimino G, Papayannidis C, Paolini S, Elia L, Fazi P, Meloni G, Amadori S, Sagalio G, Pane F, Baccarani M, Foa R. IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of accumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report. *Journal of Clinical Oncology*. 2009. 27:5202-5207.
54. van der Veer A, Zaliouva M, Mottadelli F, De Lorenzo P, Kronnie GT, Harrison CJ, et. al. IKZF1 status as a prognostic feature in BCR-ABL1-positive childhood ALL. 2014 March 13; 123(11):1691-8.

24. AUTORIZACIONES

Del Jefe de Enseñanza e Investigación

NOMBRE	FIRMA
Dr. Mauricio DiSilvio	

Del Jefe de Servicio de Hematología

NOMBRE	FIRMA
Dra. Martha Leticia Alvarado Ibarra	

Del Asesor del Protocolo (tesis)

NOMBRE	FIRMA



**“Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los
Trabajadores del Estado”**
“Informe de Avances para protocolos de investigación”

Dra. Mónica Escamilla Tilch	
-----------------------------	--

Del Director de la Unidad	
NOMBRE	FIRMA
Dr. José Alfredo Merino Rajme	

25. ANEXOS.
Anexo I. Carta de consentimiento bajo información de pacientes.
Anexo II. Carta de consentimiento bajo información de controles clínicamente sanos.
Anexo III. Cuestionario de ancestría.
Anexo IV. Aviso de privacidad.